



**UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**Médico Cirujano**

Efecto bactericida del extracto oleoso de *Artemisia absinthium* contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 confrontado con oxacilina, *in vitro*

**AUTORA:**

De La Cruz Ortiz, María Petronila (ORCID: 0000-0002-6184-9978)

**ASESORES**

Dra. Llaque Sánchez, María Rocío del P. (ORCID: 0000-0002-6764-4068)

Dra. Otiniano García, Nélida Milly Esther (ORCID: 0000-0001-9838-4847)

Mg. Polo Gamboa, Jaime (ORCID: 0000-0002-3768-8051)

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:**

Enfermedades infecciosas y transmisibles

**TRUJILLO – PERÚ**

**2020**

## **DEDICATORIA**

### **A MI MADRE**

Por ser mi incondicional, por estar siempre a mi lado alentando en cada momento. Gracias por todo tu amor y siempre confiar en mí. Te adoro mamá este nuevo logro es gracias a ti, sin ti no hubiera hecho realidad este gran sueño.

### **A MI PADRE**

Por ser mi mano derecha en todo, como no decirte gracias si siendo un agricultor me sacaste adelante, gracias por trabajar duro para que no me faltara nada. Además, gracias porque siempre estabas ahí conmigo cuando decaía y por tus enseñanzas de siempre luchar, ante todo. Te quiero papá este logro también es gracias a ti.

### **A MI HERMANO**

Mi alma gemela decirte gracias por enseñarme a luchar hasta el final, además por ayudarme a llegar a esta etapa. Gracias por siempre sostener mi mano y nunca soltarme, este logro también es gracias a ti, te quiero.

## **AGRADECIMIENTO**

### **A DIOS**

Agradezco a él por iluminarme en todo este camino largo y brindarme fuerzas necesarias para poder llegar a esta etapa de mi vida y superar todos los retos propuestos.

### **A MIS DOCENTES:**

Gracias a mis docentes Dra. María Rocío Del Pilar Llaque Sánchez, Mg. Jaime Polo Gamboa, Dra. Milly Otiniano García por su paciencia, enseñanzas y dedicación para poder realizar todo de forma impecable.

### **A LA UNIVERSIDAD PRIVADA CÉSAR VALLEJO**

Por brindarme la oportunidad de lograr mi sueño porque se acordó de los jóvenes que tenemos pocas probabilidades de seguir por nuestros sueños, además por brindarme buenos maestros que me impartieron enseñanzas para ser un profesional de éxito.

## Índice de contenidos

	<b>Pg.</b>
<b>Dedicatoria</b>	ii
<b>Agradecimiento</b>	iii
<b>Índice de contenidos</b>	iv-v
<b>Resumen</b>	vi
<b>Abstract</b>	vii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1-3
<b>II. MARCO TEÓRICO</b>	3-8
<b>III. METODOLOGÍA</b>	8
3.1. Tipo y Diseño de investigación	8
3.2. Variables y operacionalización	8-9
3.3. Población, muestra, muestreo, unidad de análisis y muestreo	9
3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	10
3.5. Procedimientos	10
3.6. Métodos de análisis de datos	10
3.7. Aspectos éticos	10
<b>IV. RESULTADOS</b>	11-14
<b>V. DISCUSIÓN</b>	15-17
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	18

## VII. RECOMENDACIONES

19

## REFERENCIAS

## ANEXOS

### Índice de tablas

Tabla 1: Datos descriptivos de las medias de los halos de inhibición del extracto oleoso de <i>Artemisia absinthium</i> contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, confrontado con Oxacilina in vitro.	11
Tabla 02: Análisis de varianza (ANOVA) de las medias de los halos de inhibición del extracto oleoso de <i>Artemisia absinthium</i> contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, confrontado con Oxacilina in vitro.	12
Tabla 03: Análisis post ANOVA de Tukey, de las medias de los halos de inhibición del extracto oleoso de <i>Artemisia absinthium</i> contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, confrontado con Oxacilina in vitro.	13

### Índice de figuras:

Figura 01: Distribución de las medias de los halos de inhibición del extracto oleoso de <i>Artemisia absinthium</i> contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, confrontado con Oxacilina in vitro.	14
---	----

## RESUMEN

En la presente investigación se evaluó el efecto bactericida del extracto oleoso de *Artemisia absinthium* a concentraciones de 100%, 75 %, 50%, 25%, y un control neutro contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparado con Oxacilina 1µg. Se realizaron 11 repeticiones por grupo estudiado, aplicando el método de Kirby Bauer. Se obtuvo que las concentraciones al 25% y 50% no tuvieron efecto inhibitorio. Al 75% la media de inhibición fue 13,18 mm (DS: 0,98165, IC95% 12,5223 - 13,8413), y al 100% fue 21,36 mm (DS 1,12006, IC95% 20,6112 - 22,1161), evidenciando efecto bactericida pero no superan a Oxacilina (media: 42,45 mm DS 1,0353 IC 95% 41,7587 – 43,1504). La prueba de Levene evidenció la homogeneidad de varianzas ( $p>0.05$ ), permitiendo realizar el ANOVA de las medias de los halos de inhibición, obteniéndose  $p=0.000$ , que indica diferencia altamente significativa entre las medias de los halos de inhibición. El análisis Post ANOVA de Tukey, demostró que la oxacilina tiene mejor efecto bactericida que las concentraciones de *Artemisia absinthium* contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Se concluye que el extracto oleoso de *Artemisia absinthium* tuvo efecto bactericida contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a mayor concentración.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, *Artemisia absinthium*, bactericida

## ABSTRACT

In this study, the bactericidal effect of extract of *Artemisia absinthium* oil was evaluated at concentrations of 100%, 75%, 50%, 25%, plus a neutral control, against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 compared to Oxacillin 1µg. There were 11 repetitions per group studied, applying Kirby Bauer's method. It was observed that the concentrations at 25% and 50% had no inhibitory effect. At 75% the mean inhibition was 13.18 mm (SD: 0.98165, IC95% 12.5223 - 13.8413), and at 100% it was 21.36 mm (SD 1.12006, IC95% 20.6112 - 22.1161), evidencing bactericidal effect but not greater than Oxacillin (mean: 42.45 mm SD 1.0353 IC 95% 41.7587 - 43.1504). Levene test showed the homogeneity of variances ( $p>0.05$ ), allowing ANOVA of mean inhibition zones, obtaining  $p=0.000$ , indicating highly significant difference between mean inhibition zones. Tukey Post-ANOVA analysis showed that oxacillin has a better bactericidal effect than *Artemisia absinthium* concentrations against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. It is concluded that extract of *Artemisia absinthium* oil had bactericidal effect against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 at higher concentration.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, *Artemisia absinthium*, bactericidal.

## I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, existe un creciente interés en cuanto a la medicina tradicional que tiene fines terapéuticos para la prevención o tratamiento de patologías. La OMS en el 2002 publicó un documento para lograr la integración y mayor reconocimiento de esta práctica por eso los sistemas nacionales de salud están utilizándolo de manera segura.<sup>1</sup> En el esfuerzo por solucionar los problemas de salud, aumentó el uso de fitoterapia en especial de los compuestos como los aceites esenciales, que son considerados científicamente útiles como terapias coadyuvantes.<sup>2</sup>

*Staphylococcus aureus* (SA), es una bacteria gram positiva, que es considerada como agente oportunista debido a que coloniza con facilidad en las personas con disminución en el sistema inmunológico, además es causante de intoxicaciones alimentarias, infecciones en piel e infecciones respiratorias.<sup>3</sup> Puede ingresar por diferentes vías por lo que causa diferentes infecciones de acuerdo al sistema donde se ubique, ésta capacidad lo tiene gracias a su cápsula mucoide externa que ayuda a la adherencia al organismo humano.<sup>4</sup> *Staphylococcus aureus* en 50% coloniza la piel y mucosas en adultos y niños sanos, 80% de forma intermitente y el 20 % de forma permanente.<sup>5</sup>

Un problema preocupante a nivel mundial es la resistencia bacteriana que aumenta cada año, entre ellas se encuentra las bacterias gram positivas. Una de las bacterias causales de infecciones intrahospitalarias en el mundo es *Staphylococcus aureus*, entre las cepas con mayor incidencia tenemos SA-MRSA que genera complicaciones letales en los hospitales.<sup>6</sup>

En el Perú ha aumentado el índice de resistencia antimicrobiana por el uso irracional y constante de medicamentos para diferentes patologías. Se realizó un estudio que demostró que el 60% de *Staphylococcus aureus* aislados a partir de hemocultivos de varios hospitales de Lima fueron resistentes a metilicina, y solo 40% eran no resistentes.<sup>7</sup>

Como una alternativa de tratamiento natural se está evaluando el uso de plantas



medicinales entre ellas la *Artemisia absinthium* “ajenjo”, que es cultivada en la selva, sierra y costa siendo utilizada como planta medicinal; además de ser aromática. Entre sus componentes, se encuentra un aceite esencial que posee acciones como antiparasitario, antimicrobiano además de ayudar a las funciones digestivas.<sup>8</sup>

La fitoterapia es una medicina alternativa o complementaria que actualmente se usa de forma terapéutica como sustituta de la medicina convencional. La fitoterapia se utilizaba desde la antigüedad para poder aliviar la sintomatología de diferentes enfermedades; esta forma de tratamiento ha sobrevivido año tras año a través de las culturas por falta de acceso a la medicina convencional.<sup>9</sup>

En el presente estudio se plantea como problema de investigación: ¿El extracto oleoso de *Artemisia absinthium* “ajenjo” tiene efecto bactericida contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en comparación con oxacilina, in vitro?

Esta investigación se justifica debido a que las infecciones por *S. aureus* son frecuentes por su alta colonización en las personas y es un riesgo para el ser humano, además la resistencia a los antibióticos motiva a estudiar nuevas alternativas para combatir esta bacteria. La medicina alternativa es importante porque posee efectos adversos menores que los medicamentos y, además, las plantas medicinales son fuente de diferentes fármacos. En esta investigación, se analizará la magnitud antimicrobiana de *Artemisia absinthium* “ajenjo” contra una de las bacterias más resistente a antibióticos como es el *S. aureus*.

En la sociedad se usa múltiples plantas medicinales para curar enfermedades, ya que por diferentes razones, en muchos casos la población no tiene acceso a medicamentos del sistema de salud, por eso actualmente a nivel mundial se está optando por la medicina alternativa, como la fitoterapia que promueve la utilización de plantas debido a sus principios activos que contribuyen a combatir diferentes enfermedades, por eso es usada como una iniciativa para el tratamiento de infecciones evitando el aumento de resistencia a antibióticos.

El objetivo general: Valorar el efecto bactericida del extracto oleoso de *Artemisia absinthium* “ajenjo” contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en sus diferentes diluciones comparado con oxacilina 1 µg.

Los objetivos específicos: Establecer el efecto bactericida del extracto oleoso de *Artemisia absinthium* “ajenjo” al 25%, 50%, 75%, 100% contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Además, establecer el efecto bactericida por oxacilina 1 µg contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Hipótesis de investigación: El extracto oleoso *Artemisia absinthium* “ajenjo” posee efecto bactericida contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en comparación con oxacilina 1 µg. Y como hipótesis nula: El extracto oleoso *Artemisia absinthium* “ajenjo” no posee efecto bactericida contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en comparación con oxacilina 1 µg

## II. MARCO TEÓRICO

Se han realizado muchas investigaciones sobre el uso de plantas para combatir las infecciones por *S. aureus*, entre las que se encuentra la de Maslova et al <sup>10</sup> (Rusia, 2019), quienes determinaron la sensibilidad de *S. aureus*, frente a extractos de *A. absinthium*, observando que es más sensible con el extracto de etanol. También observaron que mediante el extracto etanol de las hojas la inhibición del crecimiento es de 17.6 mm con el 100% del extracto y mediante el extracto de las flores su inhibición de crecimiento es de 16 mm con el 100%.

Satorov<sup>11</sup> (USA, 2019) en su estudio del extracto de etanol de *Artemisia absinthium* demostró un alto grado de actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, entre otras bacterias, mostrando una inhibición de 15 mm, con el extracto concentrado.

Cerón<sup>12</sup> (Ecuador, 2018) determinó el efecto antimicrobiano contra *Streptococcus mutans* del extracto hidroalcohólico y acuoso a 15% y 30% de la *Artemisia absinthium*. Las diluciones de los extractos acuosos, mostraron halos de inhibición de 6 mm; mientras que las del extracto hidroalcohólico fueron: al 15% (7,9 mm ±

0,788 mm) y al 30% (12,3 mm  $\pm$  0,923 mm). Concluyendo que los extractos evaluados no poseen efecto antibacteriano frente al *Streptococcus mutans*.

Stanković<sup>13</sup> (Serbia, 2016) estudió la actividad antimicrobiana y antioxidantes de los aceites esenciales de las plantas aromáticas, realizando un análisis comparativo de varias especies vegetales entre ellas *Artemisia absinthium*, contra bacterias entre ellas, *S. aureus*. Los valores de la CMI variaron entre 4.72 a 93.2 mg/mL. Concluyen que los aceites esenciales de la planta pueden contribuir como agentes efectivos contra la resistencia bacteriana.

Ez zoubi et al<sup>14</sup> (Marruecos, 2016) demostraron la eficacia antimicrobiana y además el análisis químico del aceite esencial mostró que es rico en tuyaona. Por otro lado, tiene actividad frente a *S. aureus* con diámetro de inhibición igual a  $25 \pm 1,4$  mm.

Msaada et al<sup>15</sup> (Túnez, 2015) investigaron la composición química y el efecto antioxidante y antimicrobiano de *Artemisia absinthium* L., determinando que la variabilidad química de los extractos de ajeno, es dependiente de la zona y ello afectaba la respuesta ante los microorganismos. Demostraron que el ajeno estaba dotado de actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* con un diámetro de inhibición igual a  $25 \pm 1,13$  mm.

Valverde<sup>16</sup> (Ecuador, 2015) analizó la actividad biológica de varios aceites esenciales entre ellos el *Artemisia absinthium*. La actividad antibacteriana fue estimada con cepas de *S. aureus*, entre otras bacterias, obtuvo halos inhibitorios para cada especie, para *A. absinthium* fue de 31,57  $\mu$ g/ml.

Reza et al<sup>17</sup> (Irán, 2015) demostraron la eficacia antimicrobiana de *Artemisia absinthium* contra bacterias entre ellas *S. aureus* comparado con ofloxacino con un diámetro de crecimiento bacteriano de 14,4 mm por otro lado el extracto de *Artemisia absinthium* en concentración mínima inhibitoria (CMI) de 666 mg / ml ( $14,9 \pm 1,91$  mm) y 750 mg / ml ( $17,4 \pm 1,15$  mm) demostrando halos inhibitorios más altos que ofloxacino. Además, nos indican que la falta de la membrana citoplasmática en las bacterias positivas facilita la entrada del aceite esencial causando un aumento en la permeabilidad iónica y componentes celulares internos que resultan dañando el sistema enzimático.

Taherkhani et al <sup>18</sup> (Irán, 2013) analizaron el aceite esencial de las hojas de *Artemisia absinthium* mediante cromatografía encontrando en su mayoría: 1,8-cineol (36,46%), borneol (25,99%) y alcanfor (10,20%). Además, analizaron la actividad antimicrobiana de 5 bacterias entre ellos contra *Staphylococcus aureus* que se obtuvo una zona de inhibición de 32 mm, con una concentración mínima inhibitoria de 1mg/ml y una concentración bactericida mínima 2.5 mg/ml y tiempo de reducción de valor D-decimal que es de 8.21 minutos, por otro lado, se observó que el tiempo de exposición al aceite influye para completar el efecto bactericida.

Baykan et al <sup>19</sup> (Turquía, 2012) determinaron las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de *Artemisia absinthium* mediante difusión en disco. *S. aureus* la bacteria con más sensibilidad al ajeno, el equivalente de  $\alpha$ -tocoferol del extracto de *Artemisia absinthium* tuvo un resultado  $5.87 \pm 0.17$  mm. Los efectos de los aceites esenciales se deben al alto contenido de  $\alpha$ -tuyona, siendo el compuesto con mayor porcentaje en la planta.

Alvarado et al <sup>20</sup> (Ecuador, 2009) evaluaron el efecto antibacteriano en un método de dilución seriada con tubos frente a *Staphylococcus aureus* con los extractos oleosos y acuosos del ajeno; consideraron la altitud en la que se desarrolló la planta para ver si alteraba el resultado. Mostraron una concentración mínima inhibitoria de 8mg/ml, con concentraciones al 100 %. La altitud no afectó la actividad bacteriana.

Barrios et al <sup>21</sup> (Perú, 2017) determinaron efecto antibacteriano del aceite etéreo de *Artemisia absinthium* analizando diversas concentraciones 0.16% a 100% del aceite, sobre *S. aureus* ATCC 25923. Encontraron eficacia antibacteriana, con halos de inhibición de 12.3 a 19.5 mm, pero a la concentración de 0.16% no hubo inhibición, compararon con eritromicina  $29.1 \text{ mm} \pm 0,58 \text{ mm}$ .

Aquino<sup>22</sup>(Perú, 2017) analizó la actividad antimicrobiana de aceites esenciales de

*Artemisia absinthium* en *S. aureus*. Las concentraciones fueron: 5µl, 10µl, 20µl y 1 µl. Se evidenció sensibilidad a la concentración de 1µl con 81.25 % de inhibición ( $p= 0.0001$ ) siendo altamente significativo.

La planta medicinal *Artemisia absinthium* pertenece: clase de *Magnoliopsida*, división de *Magnoliophyta*, perteneciente al reino *plantae*, dentro de la familia de *asteraceae*, con orden *asterales*, una subclase *asteridae*, con género de *artemisia*, en la especie *Artemisia absinthium* L.<sup>23</sup>

*Artemisia absinthium* también tiene otros nombres comunes de acuerdo al lugar donde se consume como: Artemisa amarga, ajenjo, asenjo, absenta, asienjo, artemisa, ausenta, hierba santa, ajenjo mayor, incienso.<sup>24</sup>

Tiene características particulares: Planta herbácea de apariencia blanquecina de un aproximadamente de 1 metro de alto, tallo ramificado con ramas delgadas y flexibles que posee un olor muy característico. Posee hojas blancas a gris – verde pinnadas con subdivisiones lobuladas y angostas además flores distribuidas en todo el tallo, color amarillento, agrupadas de forma de racimo. Florecen justo en épocas de verano y otoño; en un clima cálido y templado.<sup>25</sup>

En la comunidad, es usado para tratar enfermedades hepáticas y nerviosas, actúa a nivel de la matriz del útero ayudando así a los trastornos menstruales además relaja el músculo liso disminuyendo los cólicos, patologías gastrointestinales (como la diarrea, gases, gastritis, parásitos, indigestión, cólicos); estimula la secreción biliar permitiendo una acción descongestiva, estimula todas las funciones del hígado y secreción gástrica. Además, es utilizada para desinfectar heridas, tratar inflamaciones en diferentes sistemas. Por otro lado, en la parte doméstica es usado como insecticida contra la polilla.<sup>26</sup>

En la planta *Artemisia absinthium* se han identificado compuestos químicos entre ellos: lignanos, poliacetilenos y flavonoides entre otros. En infusiones de las hojas de *Artemisia absinthium* se han encontrado además dos cumarinas con acción alelopática y aminoácidos.<sup>22</sup>

*Artemisia absinthium* tiene una composición química variada, entre ellos los compuestos responsables del sabor amargo como las lactonas sesquiterpénicas. Por otro lado, cuando la planta se encuentra en floración brinda la máxima concentración del aceite esencial. El aceite esencial está compuesto principalmente de ( $\alpha + \beta$ ) tuyona (70%) además de absintol (1.3%), se encontraron en mínimas cantidades: anabsintina, absintina, artamaridina matricina, fitosterol, artamarina taninos ácidos, artamarinina, artemetina, ácidos nicotínico carotenoides, y palmítico, quebrachitol y pequeñas cantidades de vitamina C. Las partes verdes (hojas y tallo) contienen glucósido que es la lactosa y la semilla seca que contiene: grasa (33.4%), ceniza (6.6 %) y proteína (25.8%).<sup>27</sup>

El aceite esencial de las plantas es producto del metabolismo secundario además es una combinación sustancias aromáticas y componentes volátiles que se encuentran en las diferentes partes como flores, hojas, tallo, raíces.<sup>28</sup>

En cuanto al mecanismo de acción como antimicrobiano que ejercen los compuestos aromáticos, éste ocurre sobre la membrana citoplasmática, alterando la estructura y su función, esto se debe a la acción sobre el peptidoglicano, ocasionando la separación de la membrana celular mediante la separación de los lípidos; lo que hace la membrana más permeable, permitiendo la filtración de iones y otros contenidos celulares.<sup>20</sup>

Las bacterias del género *Staphylococcus* son cocos gram positivos inmóviles, productores de coagulasa y que llega a medir entre 2 a 0.5  $\mu\text{m}$ , es anaerobio facultativo y aerobio, su nombre viene porque se presentan en grupos de racimos irregulares (racimos de uva). El *S. aureus* posee la capacidad de convertir el fibrinógeno a fibrina mediante una enzima de superficie llamada coagulasa.<sup>29</sup>

En muchos microorganismos la composición de la pared celular es: peptidoglicano y los ácidos teicoicos. Los ácidos representan el 40% de la pared y el 60% lo compone el peptidoglicano, este es el encargado de dar la estabilidad y forma a la bacteria. El *S. aureus* crece en medio selectivo que es el agar sal manitol, pero también puede ser cultivado en agar chocolate y agar sangre.<sup>30</sup>

*Staphylococcus aureus* causa diversas enfermedades como endocarditis, infección del sistema nervioso central, infecciones tejido blando y piel. La Oxacilina (beta-lactámicos) es el gold estándar para las infecciones por *Staphylococcus aureus*, en cambio cuando se observa sensibilidad a meticilina, se pueden utilizar otros fármacos como: Cotrimoxazol, Daptomicina, Linezolid, Vancomicina, los cuales son utilizados de acuerdo a la gravedad de la invasión estafilocócica. <sup>31</sup>

Oxacilina pertenece a los antibióticos beta-lactámicos, pertenece al grupo las isoxazolil penicilina, es un bactericida que inhibe la síntesis de la pared bacteriana. Su actividad es de amplio espectro por lo que también actúa sobre las bacterias gram positivas tales como: *S. pyogenes* y *S. pneumoniae*. <sup>32</sup>

### III. METODOLOGÍA

#### 3.1. Tipo y Diseño De investigación:

**Tipo de estudio:** Básico <sup>33</sup>

**Diseño de investigación:** Experimental de estímulo creciente con repeticiones múltiples, post prueba. <sup>34</sup> (Anexo N°01)

#### 3.2 Variables y Operacionalización de variables (Anexo N°02)

**Variable Independiente:** Agente bactericida.

- No farmacológico: El aceite oleoso de *Artemisia absinthium*, con concentraciones 100%, 75 %,50%,25%.
- Farmacológico: Oxacilina sódica a 1µg.

**Variable Dependiente:** Efecto bactericida. Según criterios de CLSI <sup>35</sup>

- Con efecto: ≥13 mm del halo de inhibición.
- Sin efecto: <13 mm del halo de inhibición.

#### 3.3. Población, muestra y muestreo

**Población:** Las cepas estándar de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

- **Criterios de inclusión:** Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 con evidencia de crecimiento bacteriano de 24 horas de cultivo.
- **Criterios de exclusión:** Cultivos inertes y cultivos contaminados, que no evidencia desarrollo microbiano. Planta no expuesta a herbicidas o fungicidas.

**Muestra:** La muestra se calculó mediante la fórmula para comparación en dos promedios.<sup>36</sup> Obteniéndose una muestra de 10.78 pero se consideró aproximar a 11 repeticiones por cada grupo a analizar. (Anexo N°03)

**Muestreo:** Probabilístico, aleatorio simple.<sup>36</sup>

**Unidad de análisis:** Cada colonia de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

**Unidad de muestreo:** Cada placa petri con los cultivos de las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

### 3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos:

**La técnica:** La observación de campo del crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en las placas petri, además de la medición de los halos inhibitorios.<sup>33</sup>

**Instrumento de recolección de datos:** Se elaboró una ficha de campo para recolección de datos por el investigador, en dicha ficha se registró la medida de halos inhibitorios por cada dilución mencionada anteriormente en la cantidad de placas petri seleccionadas. (Anexo N°04)

**Validez y confiabilidad del instrumento:** El instrumento ha sido revisado mediante la técnica de juicio de especialistas.<sup>36</sup> El equipo fue conformado por 1 biólogo y 2 médicos (Anexo N°05) quienes garantizaron la utilidad del instrumento para poder registrar la información obtenida.



**3.5. Procedimientos:** Se consideró los siguientes pasos: (Anexo N°06)

- a. La identificación taxonómica de la planta se realizó en el Herbario de la Universidad Nacional de Trujillo.
- b. El aceite esencial de *Artemisia absinthium*, se obtuvo mediante el método de destilación por arrastre con vapor que dura aproximadamente una hora.<sup>37,38,39</sup>
- c. Se utilizó el medio de cultivo Müller- Hinton para cultivar las cepas de *S. aureus* ATCC 25923 de acuerdo a las normas Center for the Study of Language and Information (CLSI).<sup>40,41</sup>
- d. Se investigó la susceptibilidad antibacteriana midiendo los halos inhibitorios basándonos en CLSI lo cual establece sus propias normas y procedimientos.<sup>35</sup>

### **3.6. Método de análisis de datos**

La información se transcribió en la ficha de recolección de datos en Excel para luego ser procesada mediante programa SPSS versión 26 para Windows. Luego, para el análisis estadístico se aplicó análisis de varianza ANOVA y para la diferencia significativa entre los halos de inhibición se usó la prueba de homogeneidad post ANOVA de Tukey para determinar la eficacia antibacteriana.<sup>36</sup> (Anexo 07)

### **3.7. Aspectos éticos**

Esta investigación se realizó teniendo en cuenta las pautas para evitar el daño al ambiente. También se tuvieron en cuenta las normas de bioseguridad de la OMS<sup>42</sup> relacionadas a la disposición de residuos en los laboratorios de microbiología. (Anexo N°08)

Se cumplió con los criterios para la protección de la biodiversidad establecidos en la Ley forestal y de fauna silvestre, Ley N° 29763, en su artículo 24.<sup>43</sup> (Anexo N°09)

#### IV. RESULTADOS

Tabla 1: Datos descriptivos de las medias de los halos de inhibición del extracto oleoso de *Artemisia absinthium* contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, confrontado con oxacilina in vitro

Tratamiento	N	Media (mm)	Desviación estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
Oxacilina 1 µg	11	42,4545	1,03573	41,758	43,1504	41,00	44,00
DEOA 25%	11	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
DEOA 50%	11	2,0000	3,43511	0,307	4,3077	0,000	8,000
DEOA 75%	11	13,1818	0,98165	12,522	13,8413	11,00	14,00
DEOA 100%	11	21,3636	1,12006	20,611	22,1161	19,00	23,00

Fuente: Reporte SPSS Vs 25

(\*) Diluciones de extracto oleoso de *Artemisia absinthium* (DEOA)

Tabla 2: Análisis de varianza (ANOVA) de las medias de los halos de inhibición del extracto oleoso de *Artemisia absinthium* contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, confrontado con oxacilina in vitro

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	5018,424	2	2509,212	2287,403	0,000
Dentro de grupos	32,909	30	1,097		
Total	5051,333	32			

Fuente: Tabla 1 y reporte SPSS Vs 25

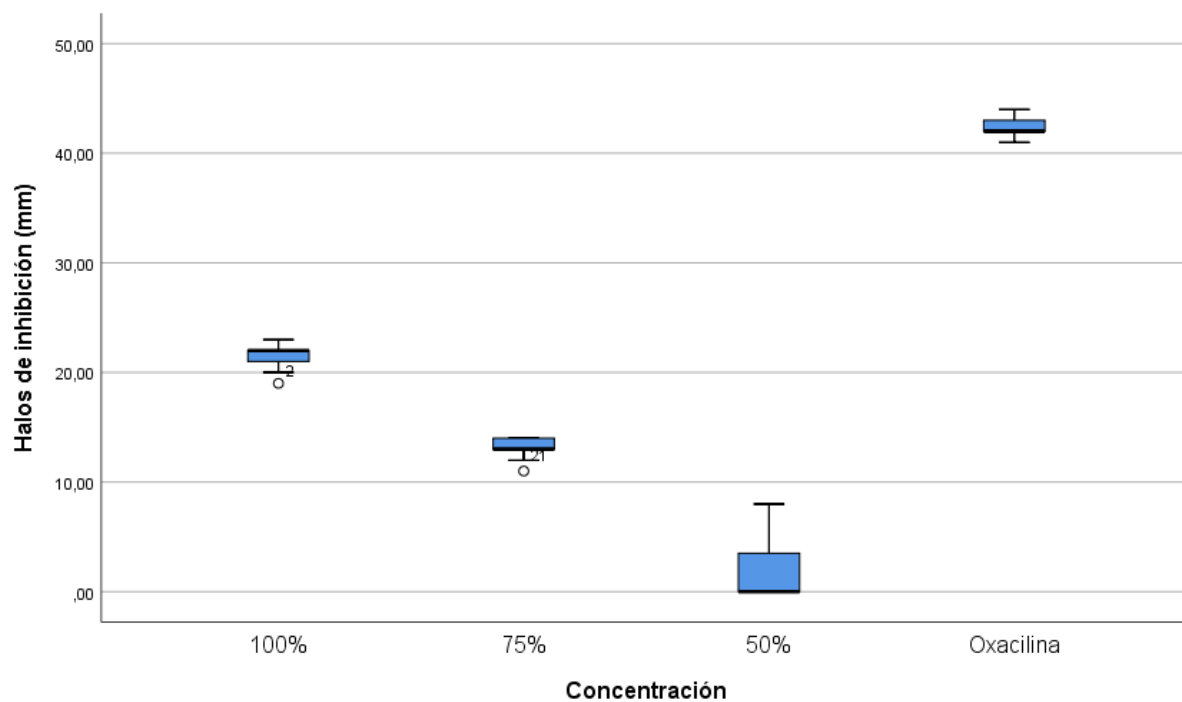
$p= 0,000$

Tabla 3: Análisis post ANOVA de Tukey, de las medias de los halos de inhibición del extracto oleoso de *Artemisia absinthium* contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, confrontado con Oxacilina in vitro

Agente antibacteriano	Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			1	2	3
<i>Artemisia absinthium</i>	75%	11	13,1818		
<i>Artemisia absinthium</i>	100%	11		21,3636	
<i>Oxacilina</i>	1 µg	11			42,4545
	Sig.		1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Fuente: Tabla 1 y reporte SPSS Vs 25



Fuente: Tabla 1 y reporte SPSS Vs 25

Figura 1: Distribución de las medias de los halos de inhibición del extracto oleoso de *Artemisia absinthium* a diferentes concentraciones contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, confrontado con oxacilina in vitro.

## V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación experimental, se evaluó el efecto bactericida del extracto oleoso de *Artemisia absinthium* a concentraciones de 100%, 75 %, 50%, 25% contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparado con oxacilina 1µg, realizando 11 repeticiones por grupo estudiado, los resultados observados fueron:

En la tabla 1 se muestran las medias de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones de *Artemisia absinthium*, donde se observa que las concentraciones al 25% y 50% no evidencian efecto inhibitorio; las concentraciones al 75 y 100% tuvieron mejor efecto. Al 75% la media de inhibición fue de 13,18 mm (DS: 0,98165, IC95% 12,5223 - 13,8413, rango: 11.00 a 14.00 mm), al 100% fue de 21,36 mm (DS 1,12006, IC95% 20,6112 - 22,1161, rango 19,00 a 23,00 mm), evidenciando acción bactericida según los criterios del CLSI ( $\geq 13$  mm). Oxacilina mostró mejor efecto inhibitorio con 42,45 mm DS 1,0353 IC 95% 41,7587 – 43,1504, rango: 41,00 – 44,00 mm.

Tabla 2, para el análisis estadístico, se consideró sólo las diluciones del extracto oleoso de *Artemisia absinthium* al 75 y 100% separando las concentraciones del 25 y 50% que no evidenciaron efecto antibacteriano. Después de realizar las pruebas de homocedasticidad ( $p > 0.05$ , Anexo N°10) se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de las medias de los halos de inhibición en el estudio, obteniéndose la  $p = 0.000$ , evidenciado que existe diferencia altamente significativa entre las medias de los halos de inhibición.

Tabla 03, representa el análisis post ANOVA de Tukey, de las medias de los halos de inhibición en donde se observa que la oxacilina tiene mejor efecto inhibitorio, seguida por *Artemisia absinthium* contra *Staphylococcus al 100%*, estos resultados se evidencian mejor en la Figura 01.

Los estudios de otros autores, analizan los extractos etanólicos u oleosos de la plantas, evidenciando que sus resultados son semejantes a los del presente estudio así tenemos: Maslova et al <sup>10</sup> con el extracto etanólico de las hojas al 100% (17.6 mm) y el extracto de las flores (16 mm), Satorov<sup>11</sup> extracto de etanol (15 mm), Reza et al <sup>17</sup> (14,4 mm), con CMI de 666 mg / ml (14,9 ± 1,91 mm) y 750 mg / ml (17,4 ± 1,15 mm), Barrios et al. <sup>21</sup> con aceite etéreo al 100% (12.3 a 19.5 mm), Baykan et al<sup>19</sup> el equivalente de  $\alpha$ -tocoferol del extracto (5.87 ± 0.17 mm) y Aquino <sup>22</sup> aceites esenciales, a la concentración: 1 $\mu$ l, con 81.25 % de inhibición ( $p= 0.0001$ ) y Stanković <sup>13</sup> CMI entre 4.72 a 93.2 mg/mL.

Otros autores evidencian mayor efecto inhibitorio de *Artemisia absinthium*: Taherkhani et al <sup>18</sup> 32 mm, CMI 1mg/ml y una concentración bactericida mínima 2.5 mg/ml y tiempo de reducción de valor D-decimal de 8.21 minutos, Valverde<sup>16</sup> con aceites esenciales (31,57  $\mu$ g/ml). Ez zoubi et al <sup>14</sup> (25 ± 1,4 mm), Msaada et al<sup>15</sup> (25 ± 1,13 mm). Cerón<sup>12</sup> también demuestra el efecto antimicrobiano contra *Streptococcus mutans* de los extractos hidroalcohólicos 15% (7,9 mm ± 0,788 mm) y 30% (12,3 mm ± 0,923 mm).

Ez zoubi et al <sup>14</sup> manifiestan que al tener la planta entre sus compuestos “tuyona” esta sería un elemento importante en su eficacia antibacteriana. De igual forma Baykan et al<sup>19</sup> manifiestan que los efectos de los aceites esenciales se deben al alto contenido de  $\alpha$ -tuyona. Y Taherkhani et al <sup>18</sup> encontraron mediante cromatografía que en el aceite esencial de las hojas de *Artemisia absinthium*, en su mayoría contienen: 1,8-cineol (36,46%), borneol (25,99%) y alcanfor (10,20%), observó que el tiempo de exposición al aceite influye para completar el efecto bactericida.

Reza et al <sup>17</sup> consideran que la falta de membrana citoplasmática en las bacterias positivas facilita el ingreso de aceite esencial produciendo aumento de la permeabilidad iónica y componentes celulares internos, dañando así el sistema enzimático.

En relación a los efectos antimicrobianos de la planta, Stanković <sup>13</sup> considera que

los aceites esenciales de la planta pueden contribuir como agentes efectivos contra la resistencia bacteriana. Msaada et al<sup>15</sup> indican que la composición química y el efecto antioxidante y antimicrobiano de los extractos de ajeno, es dependiente de la zona y ello afectaba la respuesta ante los microorganismos. Así mismo, Alvarado et al.<sup>20</sup> consideraron evaluar si la altitud en la que se desarrolló la planta alteraba el resultado antibacteriano de la planta, encontrando que esta no afectó su actividad bacteriana.

La teoría concuerda con Ez Zoubi et al<sup>14</sup>, Baykan et al<sup>19</sup> y Taherkhani et al <sup>18</sup> quienes observaron que en el aceite esencial de las hojas de *Artemisia absinthium* se encuentra un compuesto importante que es la alfa- Tuyona encargada del efecto antimicrobiano sobre la membrana plasmática que altera el peptidoglicano ocasionando alteración.



## VI. CONCLUSIONES

1. El extracto oleoso de *Artemisia absinthium* mostró efecto inhibitorio contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
2. Los extractos oleosos de *Artemisia absinthium* al 25 y 50% no evidencian efecto inhibitorio contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
3. Los extractos oleosos de *Artemisia absinthium* al 75 y 100% tienen mejor efecto inhibitorio contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
4. La oxacilina tiene mayor efecto inhibitorio sobre la cepa estudiada.

## VII. RECOMENDACIONES

- Evaluar en diferentes altitudes y suelos a *Artemisia absinthium* para determinar si existe variación en sus componentes bioactivos y si el efecto bactericida se modifica.
- Ampliar la investigación sobre el efecto antimicrobiano en otras bacterias gram negativas, gram positivas y hongos.
- Promover la investigación, en la identificación de los principios activos de *Artemisia absinthium* a fin de evaluar otras aplicaciones que pueden ser útiles en medicina complementaria.

## REFERENCIAS

1. OMS. Portal de Información - Medicamentos Esenciales y Productos de Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. OMS; 2013. [Citado 23/07/2019]. Disponible desde: <https://apps.who.int/medicinedocs/es/m/abstract/Js21201es/>
2. Quispe M, Quispe C. Plantas medicinales utilizadas como alternativa de tratamiento en parasitosis en los pobladores del barrio del distrito de Pucará – Huancayo [tesis doctoral]. Perú. Universidad Roosevelt; 2018. Disponible desde: <http://repositorio.uroosevelt.edu.pe/xmlui/bitstream/handle/ROOSEVELT/140/INFORME%20FINAL%20PLANTAS%20MEDICINALES%20PARASITOSIS%20%281%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
3. Socorro G, Avalos G, Soto M. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. Revista biomédica. [Internet]. 2014 [Citado 23/07/2019]; 25(3): 35-39. Disponible desde: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2014/bio143d.pdf>
4. Cervantes E, García R, Salazar P. Características generales del *Staphylococcus aureus*. Revista Medigraphic. México; 2017. [citado 09/10/2019]; 461 (1): 28-40. Disponible desde: <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>
5. Cervantes E, García R. Características generales de *Staphylococcus aureus*. Revista latinoamericana patológica clínica médica laborista. [Internet]. 2014 [Citado 23/07/2019]; 61 (1):15-22. Disponible desde: [https://www.academia.edu/16267306/Caracter%C3%ADsticas\\_generales\\_d\\_el\\_Staphylococcus\\_aureus](https://www.academia.edu/16267306/Caracter%C3%ADsticas_generales_d_el_Staphylococcus_aureus)
6. Todd J. Infecciones estafilocócicas. Revista boliviana pediátrica. [Internet] 2009. [Citado 23/07/2019]; 44 (3): 2-12. Disponible desde: [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1024-06752005000300010](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1024-06752005000300010)
7. Tamariz J, Agapito J, Horna G, Tapia E, Vicente W, Silva M, et al. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina adquirido en la comunidad

- aislados en tres hospitales de Lima-Perú. Revista Médica Herediana [Internet]. 2010. [Citado 23/07/2019]; 21(1): 23-43 Disponible desde: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1018-130X2010000100002](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2010000100002)
8. Organización Panamericana de la salud. Manual de Fitoterapia: Monografías de plantas medicinales. ESSalud/OPS [Internet]. Capítulo VII 2001. Pp.11-12. [citado 23/07/2019]. Disponible desde: <http://www.bvsde.paho.org/texcom/manualesMEC/fitoterapia/cap7.pdf>
  9. Gallegos Z. Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. An Fac Med. [internet]. 2016. [citado 01/08/2019]; 77 (4): 22-25. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/afm/v77n4/a02v77n4.pdf>
  10. Maslova E, Semykina V, Glodik T. Determination of Antibacterial Activity of *Artemisia Absinthium* L. (Asteraceae) Extracts. Copyright [Internet]. 2019, the Authors. Published by Atlantis Press. [Citado 2/2/20]. Disponible desde: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>
  11. Satorov S, Mirzoeva F, Dushenkov V. Comparative characteristics of antibacterial activity of plants growing in the central part of the republic of Tajikistan [Internet]. 2019 [Citado 2/2/20]; 21(4): 643-54. Disponible desde: <https://doi.org/10.25005/2074-0581-2019-21-4-643-654>
  12. Cerón N. "Efecto antibacteriano del extracto de ajenojo (*Artemisia absinthium*) sobre la cepa *Streptococcus mutans*. Estudio in vitro. [tesis doctoral]. Ecuador. Universidad central del Ecuador. 2018. pp.4-14. Disponible desde: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/16940/1/T-UCE-0015-ODO-061.pdf>
  13. Stanković N, Mihajilov T. Comparative study of composition, antioxidant, and antimicrobial activities of essential Oils of selected aromatic plants from Balkan Peninsula. Planta Medic. [Internet]. 2016. [Citado 6/08/2019]; pp.8-33 Disponible desde: [https://www.researchgate.net/publication/295076695\\_Comparative\\_Study\\_of\\_Composition\\_Antioxidant\\_and\\_Antimicrobial\\_Activities\\_of\\_Essential\\_Oils\\_of\\_Selected\\_Aromatic\\_Plants\\_from\\_Balkan\\_Peninsula](https://www.researchgate.net/publication/295076695_Comparative_Study_of_Composition_Antioxidant_and_Antimicrobial_Activities_of_Essential_Oils_of_Selected_Aromatic_Plants_from_Balkan_Peninsula)

14. Ez zoubi Y, Farah A, Maniar S, Ouali L. In Vitro, Antibacterial Efficacy of Essential Oils from Moroccan Plants Against Pathogenic Bacteria Isolated from Hospital Environment in Morocco. International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research [internet]. 2016 [Citado 25/09/2020]; 8(6): 610-615. Disponible desde: [www.ijpcr.com](http://www.ijpcr.com)
15. Msaada K, Nidhal S, Olfa B, Slim B, Tammar S, Alfaify A, et al. Chemical Composition and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Wormwood (*Artemisia absinthium* L.) Essential Oils and Phenolics. Hindawi Publishing Corporation, Journal of Chemistry [Internet], 2015 [Citado 4/2/2020]; Article ID 804658, 12 pages. Disponible desde: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/804658>
16. Valverde P. Composición química, potencial antimicrobiano y letal de los aceites esenciales de las hojas de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*), Mastrante (*Ageratum conyzoides*), Guabiduca (*Piper carpunya*), Ajenjo (*Artemisia absinthium*) y Cedrón (*Lippia citriodora*), cultivados en la república del Ecuador. [tesis doctoral]. Ecuador. Universidad técnica de Machala. 2015. pp.5-38. Disponible desde: <http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/2799/6/CD000013-TRABAJO%20COMPLETO-pdf>
17. Reza H, Mohsen R. Antibacterial effects of *Arctium lappa* and *Artemisia absinthium* extracts in laboratory conditions. J HerbMed Pharmacol [Internet]. 2015 [Citado 25/09/2020]; 4(4): 133-137. Disponible desde: <http://www.herbmedpharmacol.com>
18. Taherkhani M, Rustaiyan A, Rasooli I, Taherkhani T. Chemical composition, antimicrobial activity, antioxidant and total phenolic content within the leaves essential oil of *Artemisia absinthium* L. growing wild in Iran. African Journal of Pharmacy and Pharmacology [Internet]. 2013 [Citado 25/09/2020]; 7(2):30-36. Disponible desde [http:// doi: 10.5897/AJPP12.945](http://doi.org/10.5897/AJPP12.945).
19. Baykan E, Gottfried R, Sedar G, Karabay N, Yavasogulu A, Konyalioglu S, Ahmet Z. Antimicrobial and antioxidant properties of *Artemisia* L. species from western Anatolia. Turk J Biol. [Internet]. 2012 [Citado 25/09/2020]; 36:75-84, Tubitak. Disponible desde: [http:// doi: 10.3906/biy-0912-27](http://doi.org/10.3906/biy-0912-27)

20. Alvarado G, Rodas M. Influencia de la altitud sobre la actividad antibacteriana de extractos de malva olorosa, ortiga y ajeno mediante el método de dilución seriada en tubo de ensayo. [tesis doctoral]. Ecuador. Universidad de Cuenca. 2009. pp.6-26. Disponible desde: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2484/1/tq1006.pdf>
21. Barrios L, Quispe P. efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Artemisia absinthium* L. sobre *Staphylococcus aureus*, Arequipa 2017. [Tesis doctoral]. Perú. Universidad privada autónoma de Arequipa. 2018. pp.12-35. Disponible desde: <http://repositorio.upads.edu.pe/xmlui/bitstream/handle/UPADS/8/TESIS%20PAULINA%20QUISPE%20Y%20FLOR%20DE%20LIZ%20BARRIOS%20-%20F%20y%20B.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
22. Aquino E. Actividad antimicrobiana de aceites esenciales de *Chenopodium ambrosioides*, *Artemisia absinthium*, *Caiophora cirsiifolia* sobre bacterias gram negativas *Staphylococcus aureus* y su toxicidad en Artemia salina. [Tesis doctoral]. Perú. Universidad Nacional del Altiplano. 2017. pp.15-25. Disponible desde: [http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/6069/Aquino\\_Apaza\\_Edwin.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/6069/Aquino_Apaza_Edwin.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
23. Achahui S, Quispe P. Evaluación del efecto antiespasmódico del extracto hidroalcohólico y del aceite esencial de *Artemisia absinthium* L. (Ajeno) in vivo y ex vivo. [tesis doctoral]. Perú. Universidad San Antonio Cusco. 2011. Pp.8-15. Disponible desde: [http://repositorio.unsaac.edu.pe/bitstream/handle/UNSAAC/1066/253T2011\\_0046.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unsaac.edu.pe/bitstream/handle/UNSAAC/1066/253T2011_0046.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
24. Moya M, Escudero V. Las plantas medicinales en el control de nemátodos gastrointestinales en cabras: Potencial de las plantas que crecen en la región de Coquimbo, Chile. Revista brasileña PI. Med. [Internet]. 2015 [citado 13/08/2019]; 17(3): 20-25 Disponible desde: <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v17n3/1516-0572-rbpm-17-3-0480.pdf>
25. Quillay E. Extractos orgánicos de *Chenopodium ambrosioides* (paico), *Artemisia absinthium* (ajeno), *Ocimum basilicum* (albahaca) y *Peperomia*

- inaequiafolia* (congona) como agentes antiamebianos. [Tesis doctoral]. Ecuador. Universidad de cuencas. 2018. pp.5-18. Disponible desde: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/30527/1/Trabajo%20de%20Titulaci%c3%b3n.pdf>
26. Gallegos Z. Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. An Fac Med. [Internet]. 2016. [citado 13/08/2019]; 77 (4): 23-31. Disponible desde: <http://www.scielo.org.pe/pdf/afm/v77n4/a02v77n4.pdf>
27. Peláez A, Polo S. Características farmacognóstica de las hojas *Artemisia absinthium* (ajenjo) procedente del distrito de Contumazá, provincia de Contumazá, región de Cajamarca. [tesis doctoral]. Perú. Universidad nacional de Trujillo. 2016. pp.2-17. Disponible desde: <http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/3503/Pelaez%20Morillas%20Anthony.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
28. Alzamora L, Morales L, Armas L, Fernández G. Medicina Tradicional en el Perú: Actividad Antimicrobiana in vitro de los Aceites Esenciales de Algunas Plantas Aromáticas. Revista investigación. [Internet]. 2001 [citado 09/10/2019]; 62(2): 156-161. Disponible desde: [revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/download/4167/3324](http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/download/4167/3324)
29. Tortora G. Introducción a la microbiología. 12º ed. España: Panamericana; 2017. p. 960.
30. Brooks G, Carroll K, Butel J, Morse S, Mietzner T. Microbiología Médica. 25ª ed. Estado Unidos: Mc-Graw Hill; 2011.
31. Mensa J, Soriano A, Llinares P, Barberan J, Maseda E, Montejo M et al. Guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Staphylococcus aureus*. Revista Española. Quimioterapia. [internet]. 2013. [Citado 13/08/2019]; 26 Supl. 1: 1-84. Disponible desde: <http://seq.es/seq/0214-3429/26/sup/guia.pdf>
32. Aranda Y, Chiroque G, Díaz A, Rodríguez Y, Velázquez L, LLenque L. Frecuencia de aislamiento de *Staphylococcus aureus* en Oxacilina resistente en quesos artesanales comercializados en el mercado La Unión (Trujillo,

- Perú) mayo-julio 2015. REBIOL. [Internet]. 2017. [Citado 13/08/2019]; 37(1): 20-35. Disponible desde: <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/facccbiol/article/view/2000>
33. Hernández S, Fernández C, Baptista P. Metodología de la investigación. 6ta ed. McGraw-Hill. México.2016.
  34. Tresierra A. Proyecto e informe de tesis y redacción científica. Industria gráfica ABC. Trujillo: 2013.
  35. Cavalieri S, Rankin I, Harbeck R, Sautter R, Mccarter Y, Sharp S, et al. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data. [Citado 24/09/2019]. Disponible desde: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>
  36. Wayne D. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ta edición. México: Limusa, 2006.
  37. Pereyra C. Manual de laboratorio de química orgánica I. 3ra. ed. México: UA Azcapotzalco; 2007. p. 19–22.
  38. Peredo H, Palou E, López A. Aceite esenciales: método de extracción. Temas selectos de Ingeniería de Alimentos 3-1. Universidad de Puebla. 2009. México. Pág. 24- 32. [Citado 9/10/2019]. Disponible desde: [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf)
  39. Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos para la prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el método de Disco Difusión. Lima. 2002. Pág. 16. [Citado 9/10/2019]. Disponible desde: <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual%20sensibilidad%202.pdf>
  40. Balouiri M, Sadiki M, Koraichi S. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis.[Internet]. 2016 [Citado 9/10/2019]. 6 (2): 71-79. Disponible desde: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095177915300150?via%3Dihub>

41. Bagul U, Sivagurunathan M, Sivakumar E. Antibiotic Susceptibility Testing: a review on current practices. International Journal of Pharmacy. Uddhav and Sivagurunathan. Int J Pharm [Internet]. 2016 [citado 9/10/2019]; 6(3): 11-17. Disponible desde: [https://www.researchgate.net/publication/306505267\\_ANTIBIOTIC\\_SUSCEPTIBILITY\\_TESTING\\_A\\_REVIEW\\_ON\\_CURRENT\\_PRACTICE](https://www.researchgate.net/publication/306505267_ANTIBIOTIC_SUSCEPTIBILITY_TESTING_A_REVIEW_ON_CURRENT_PRACTICE)
42. Organización Mundial de la Salud – OMS. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3ra. Edición. Ginebra: Ediciones de la OMS; 2005. [Citado 9/10/2019]. Disponible desde: [http://www.who.int/topics/medical\\_waste/manual\\_bioseguridad\\_laboratorio.pdf](http://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf).
43. Decreto legislativo. Ley forestal y de fauna silvestre- Ley N° 29763. Perú- Lima, artículo 24. 2011
44. Cruz A, Rodríguez N, Rodríguez C. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* Y *Silybum marianum*. Rev. U.D.CA Act. Div. Científica. [Internet]. 2010. [citado 24/09/2019]; 13 (2): 43-53 Disponible desde: <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v13n2/v13n2a14.pdf>
45. Brañez K. Evaluación del efecto antibacteriano in vitro del extracto de *Stevia rebaudiana* sobre el *Actinomyces viscosus* y *Streptococcus sanguinis*, bacterias iniciadoras en la formación de biofilm dental. [tesis doctoral]. Perú. Universidad Nacional Mayor De San Marcos. 2017. pp. 12-25. Disponible desde: [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/6575/Bra%C3%B1ez\\_rk.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/6575/Bra%C3%B1ez_rk.pdf?sequence=1&isAllowed=y)



## ANEXOS

### ANEXO N°01: DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

RG1	X1	01
RG2	X2	02
RG3	X3	03
RG4	X4	04
RG5	X5	05
RG6	X6	06

#### **Estableciendo:**

RG: Conjunto de investigación

X1: Dilución 100% de aceite oleoso de *Artemisia absinthium*.

X2: Dilución 75% de aceite oleoso de *Artemisia absinthium*.

X3: Dilución 50% de aceite oleoso de *Artemisia absinthium*.

X4: Dilución 25% de aceite oleoso de *Artemisia absinthium*.

X5: Control positivo: Oxacilina sódica 1µg

X6: Dimetil Sulfóxido

0: Lecturas de diámetro del halo de inhibición

## ANEXO N°02: MATRIZ DE OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
<p>V.I:</p> <p>Agente Bactericida</p>	<p>Elemento que altera las estructuras de una bacteria alterando su capacidad de supervivencia, inhibiendo el desarrollo, ya sea directa o indirectamente. <sup>44</sup></p> <p>Agente no farmacológico: aceite oleoso de <i>Artemisia absinthium</i> “ajenjo”</p> <p>Agente farmacológico: Oxacilina sódica.</p>	<p>El estudio de <i>Artemisia absinthium</i> “ajenjo” será fraccionada en 6 concentraciones.</p> <p>100% 75 % 50% 25%</p> <p>Oxacilina sódica</p> <p>DMSO</p>	<p>RG1</p> <p>RG2</p> <p>RG3</p> <p>RG4</p> <p>RG5</p> <p>RG6</p>	<p>Cualitativa nominal</p>
<p>V.D.</p> <p>Efecto bactericida</p>	<p>Es la acción que ejerce el agente antibacteriano, para eliminar o inhibir las bacterias en un momento determinado, con dosis ya establecidas. <sup>45</sup></p> <p>Se medirá a través del incremento del halo de inhibición mediante la técnica de Kirby Bauer. <sup>35</sup></p>	<p>Se considera según CLSI. <sup>35</sup></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Sensible: <math>\geq 13</math> mm</li> <li>● Intermedio: 11–12mm</li> <li>● Resistente: <math>\leq 10</math>mm</li> </ul>	<p>Con efecto: <math>\geq 13</math> mm.</p> <p>Sin efecto: <math>&lt; 13</math>mm.</p>	<p>Cualitativa nominal</p>

### ANEXO N°03: TAMAÑO DE MUESTRA

Se realizó mediante la fórmula para comparación en dos promedios.<sup>36</sup>

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 2S^2}{(X_1 - X_2)^2}$$

En donde:

$Z_{\alpha/2}$ : 1,96<sup>34</sup>

$Z_{\beta}$ : 0,842<sup>34</sup>

$X_1$ : 13 mm Diámetro del halo de inhibición de la oxacilina.<sup>35</sup>

$X_2$ : 12,3 mm Diámetro del halo de inhibición del aceite oleoso *Artemisia absinthium*.<sup>21</sup>

$\sigma$ : 0,58 mm.<sup>21</sup>

$$n = 10.78$$

Se consideró aproximar a 11 repeticiones por cada grupo a analizar.

#### ANEXO N°04: INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Los datos obtenidos fueron registrados en la siguiente ficha de recolección:

ZONA DE INHIBICIÓN (mm)						
N°	EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE PALTA				OXACILINA	DMSO
	100%	75%	50%	25%		
1	22	13	7	0	42	0
2	19	12	0	0	43	0
3	21	14	0	0	43	0
4	22	13	0	0	44	0
5	22	14	0	0	42	0
6	21	14	8	0	41	0
7	20	14	7	0	44	0
8	22	13	0	0	42	0
9	21	13	0	0	42	0
10	23	11	0	0	43	0
11	22	14	0	0	41	0

## ANEXO N°05: VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO



### FICHA DE EVALUACIÓN INSTRUMENTO POR EXPERTO

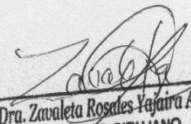
ÍTEM	CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LA VALIDEZ				CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS ESPECÍFICOS							
	CONTENIDO (Se refiere al grado en que el instrumento refleja el contenido de la variable que se pretende medir)		CONSTRUCTO (Hasta donde el instrumento mide realmente la variable, y con cuanta eficacia lo hace)		RELEVANCIA (El ítem es esencial o importante, es decir, debe ser incluido)		COHERENCIA INTERNA (El ítem tiene relación lógica con la dimensión o el indicador que está midiendo)		CLARIDAD (El ítem se comprende fácilmente, es decir, sus sintácticas y semánticas son adecuadas)		SUFICIENCIA (Los ítems que pertenecen a una misma dimensión bastan para obtener la dimensión de esta)	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
1	X		X		X		X		X		X	
2	X		X		X		X		X		X	
3	X		X		X		X		X		X	


CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS GENERALES				SI	NO	OBSERVACIONES
El instrumento contiene instrucciones claras y precisas para responder la ficha de cotejos				X		
Los ítems permiten el logro del objetivo de la investigación				X		
Los ítems están distribuidos en forma lógica y secuencial				X		
El número de ítems es suficiente para recoger la información. En caso de ser negativa la respuesta sugiera los ítems a añadir				X		
VALIDEZ						
APLICABLE	X	NO APLICABLE		APLICABLE TENIENDO EN CUENTA OBSERVACIÓN		

Validado por:

Fecha: 05 de mayo 2020

  
**Jaime A. Polo Gamboa**  
 MICROBIOLOGO  
 CBP 6951

  
**Dra. Zavaleta Rosales Yajaira A.**  
 MÉDICO CIRUJANO  
 C.M.P. 085761

  
**Dr. Juan Luis Rosales Soto**  
 MÉDICO CIRUJANO  
 C.M.P. 10059  
 Anatomía - Medicina Natural

## ANEXO N° 06: PROCEDIMIENTO

1. La identificación taxonómica de la planta se realizó en el Herbario de la Universidad Nacional de Trujillo.



2. El aceite esencial de *Artemisia absinthium*, se obtuvo mediante el método de destilación por arrastre con vapor que dura aproximadamente una hora.<sup>37, 38,39</sup>

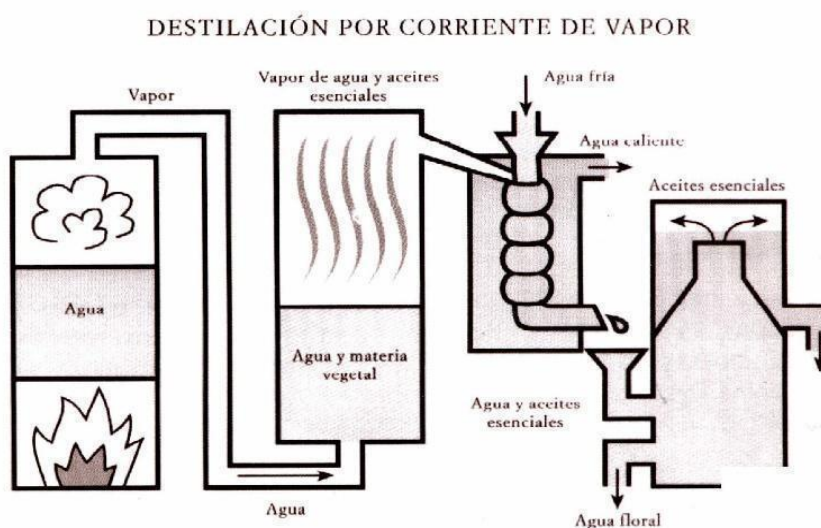
**A. Tratamiento de la muestra:** Las plantas de *Artemisia absinthium* “Ajenjo” se obtuvieron en la provincia de Huamachuco, en un aproximado de 10 kg y se llevó al laboratorio, para que se pueda seleccionar las hojas con buenas condiciones para poder obtener la “muestra fresca” (MF). La MF se lavó con agua destilada clorada y se llevó a un horno a 30-35°C por 3-4 días donde se deshidrató. Después, se sacó las hojas secas manualmente hasta obtener partículas muy pequeñas y reservar alimentándose herméticamente en bolsas negras. A esto se le consideró como “muestra seca” (MS).



**B. Obtención del Aceite Esencial:** El aceite esencial de *Artemisia absinthium* “Ajenjo” se obtuvo por el método de arrastre de vapor de agua; para ello, en un balón de 2 L se colocó 1,5 L de agua destilada y en un balón de 4 L se colocó la muestra seca hasta que se llene las 3/4 partes del balón. Ambos balones se taparon herméticamente y estuvieron conectados a través de un ducto. Al mismo tiempo el balón con la MS estaba conectado a un condensador recto (refrigerante), el cual desemboca en un embudo decantador tipo pera. Así, el balón con agua se calentó con una cocina eléctrica y el vapor de agua pasó a través del ducto hacia el balón con la MS y arrastró los componentes fitoquímicos (incluido los lípidos). Este vapor se dirigió hacia el condensador en donde se convirtió en líquido que fue dirigido



por el decantador tipo pera. Este líquido se dividió en dos fases, y quedó el aceite en la superficie por diferencia de densidades. Este proceso se realizó en 2 horas. De este modo, se obtuvo el Aceite Esencial (AE) considerado al 100%; el cual, se colocó en un frasco de vidrio ámbar y se reservó a 4°C hasta su utilización.





3. Se utilizó el medio de cultivo Müller- Hinton para cultivar las cepas de *S. aureus* ATCC 25923 de acuerdo a las normas Center for the Study of Language and Information (CLSI).<sup>39,40</sup> Se utilizó agar Muller-Hinton como medio de cultivo. Se preparó un medio para 11 placas Petri. Este medio de cultivo se esterilizó en la autoclave a 121°C por 15 minutos. Después, se colocó en Placas Petri estériles de plástico desechables, 18-20 ml por cada placa, y se dejó reposar hasta que se solidifique completamente.

#### A. Preparación del inóculo:

El inóculo se preparó colocando 3-4 ml de suero fisiológico en un tubo de ensayo estéril, al cual se le adiciona una alícuota *Staphylococcus aureus*, cultivado por 24 horas, de tal modo que se observó una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland (1,5 x10<sup>8</sup> UFC/ml).



#### B. Siembra del microorganismo:

Se sembró el microorganismo *Staphylococcus aureus*, embebiendo un hisopo estéril en el inóculo y deslizándose sobre toda la superficie del medio de cultivo en las Placas Petri (siembra por estrías en superficie); de tal modo, que el microorganismo quedó como una capa en toda la superficie.



### C. Preparación de las concentraciones del aceite esencial (AE):

A partir del AE, se preparó 4 concentraciones (100%, 75%, 50% y 25%) utilizando como solvente Dimetilsulfóxido (DMSO); para ello, se roturaron 4 tubos de ensayo estériles con las 4 concentraciones y se colocó 750  $\mu\text{L}$  de AE y 250  $\mu\text{L}$  de DMSO al tubo de 75%, 500  $\mu\text{L}$  de AE y 500  $\mu\text{L}$  de DMSO al tubo de 50%, y 250  $\mu\text{L}$  de AE y 750  $\mu\text{L}$  de DMSO al tubo de 25%.



### D. Preparación de los discos de sensibilidad con AE:

A partir de cada una de las concentraciones, se colocó 10  $\mu\text{L}$  en cada disco de papel filtro Whatman N° 1 de 6 mm de diámetro, previamente esterilizados. Se tomó 10  $\mu\text{L}$  de AE al 25% y se colocó en un disco, 10  $\mu\text{L}$  de AE al 50% en otro disco, 10  $\mu\text{L}$  de AE al 75% en otro disco y 10  $\mu\text{L}$  de AE al 100% en otro disco. Esto se repitió por 11 veces.

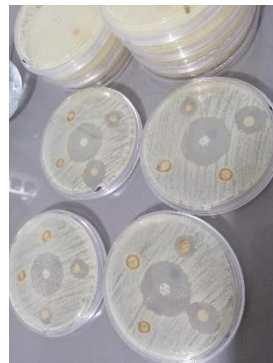


### E. Confrontación del microorganismo con el agente antimicrobiano:

Con la ayuda de una pinza metálica estéril, se tomó los discos de sensibilidad preparados, uno de cada concentración con AE, y se colocó en la superficie del agar sembrado con el microorganismo *Staphylococcus aureus*, de tal modo que quedaron los discos (uno de cada concentración) a un cm del borde de la Placa Petri y de forma equidistante. Adicionalmente, se colocó el disco con Oxacilina 1µg (control positivo). Se dejó en reposo por 15 min y después las placas se incubaron de forma invertida en la estufa a 35-37°C por 18-20 horas.



4. Se investigó la susceptibilidad antibacteriana midiendo los halos inhibitorios basándonos en CLSI lo cual establece sus propias normas y procedimientos.<sup>35</sup> La lectura se realizó observando y midiendo con una regla Vernier, el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento microbiano. Esta medición se realizó para cada una de las concentraciones de AE de *Artemisia absinthium* “Ajenjo” y para la Oxacilina. Se interpretó como sensible o resistente, según lo establecido en CLSI.



## ANEXO N°07: ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### Resumen de procesamiento de casos

Casos						
Concentración	Válido		Perdidos		Total	
	N	Porcent aje	N	Porcent aje	N	Porcent aje
1	11	100,0%	0	0,0%	11	100,0%
75	11	100,0%	0	0,0%	11	100,0%
100	11	100,0%	0	0,0%	11	100,0%

### Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>				Shapiro-Wilk		
	Concentraci ón	Estadísti co	gl	Sig.	Estadísti co	gl	Sig.
Halo	1	0,215	11	0,165	0,904	11	0,205
	75	0,252	11	0,049	0,803	11	0,010
	100	0,260	11	0,036	0,890	11	0,141

a. Corrección de significación de Lilliefors

### Prueba de homogeneidad de varianzas

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Halo	Se basa en la media	0,167	2	30	0,847
	Se basa en la mediana	0,047	2	30	0,954
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	0,047	2	26,632	0,954
	Se basa en la media recortada	0,143	2	30	0,868

## Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Halo

HSD Tukey

(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1	75	29,27273*	0,44660	0,000	28,1717	30,3737
	100	21,09091*	0,44660	0,000	19,9899	22,1919
75	1	-29,27273*	0,44660	0,000	-30,3737	-28,1717
	100	-8,18182*	0,44660	0,000	-9,2828	-7,0808
100	1	-21,09091*	0,44660	0,000	-22,1919	-19,9899
	75	8,18182*	0,44660	0,000	7,0808	9,2828

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

## **ANEXO N°08: NORMAS DE BIOSEGURIDAD PARA EL TRABAJO EN LABORATORIO**

El personal involucrado en los diferentes procesos aplicó las medidas de bioseguridad establecidas en las Normas de bioseguridad. <sup>42</sup>

1. Se usó en todo momento batas o uniformes especiales para el trabajo en el laboratorio.
2. Se usó guantes protectores apropiados para todos los procedimientos que estuvieron en contacto directo o accidental con sangre, líquidos corporales y otros materiales potencialmente infecciosos o animales infectados.
3. Una vez utilizados, los guantes se retiraron de forma aséptica y a continuación se lavaron las manos.
4. El personal se lavó las manos después de manipular materiales y animales infecciosos, así como antes de abandonar las zonas de trabajo del laboratorio.
5. Se usaron gafas de seguridad, viseras u otros dispositivos de protección cuando sea necesario proteger los ojos y el rostro de salpicaduras, impactos y fuentes de radiación ultravioleta artificial.
6. Prohibido el uso de las prendas protectoras fuera del laboratorio, por ejemplo, en cantinas, cafeterías, oficinas, bibliotecas, salas para el personal y baños.
7. No se usó calzado sin puntera.
8. En las zonas de trabajo estaba prohibido comer, beber, fumar, aplicarse cosméticos o manipular lentes de contacto.
9. Estaba prohibido almacenar alimentos o bebidas para consumo humano en las zonas de trabajo del laboratorio.
10. La ropa protectora de laboratorio no se guardó en los mismos armarios o taquillas que la ropa de calle.

**ANEXO N°09: Ley Forestal y de Fauna Silvestre**  
**LEY N° 29763**

**Artículo 4. Patrimonio forestal y de fauna silvestre de la Nación** <sup>43</sup>

El patrimonio forestal y de fauna silvestre de la Nación está constituido por lo siguiente:

- a. Los ecosistemas forestales y otros ecosistemas de vegetación silvestre.
- b. Los recursos forestales y de fauna silvestre mantenidos en su fuente.
- c. La diversidad biológica forestal y de fauna silvestre, incluyendo sus recursos genéticos asociados.
- d. Los bosques plantados en tierras del Estado.
- e. Los servicios de los ecosistemas forestales y otros ecosistemas de vegetación silvestre.
- f. Las tierras de capacidad de uso mayor forestal y tierras de capacidad de uso mayor para protección, con bosques o sin ellos.
- g. Los paisajes de los ecosistemas forestales y otros ecosistemas de vegetación silvestre en tanto sean objeto de aprovechamiento económico.

Las plantaciones forestales en predios privados y comunales y sus productos se consideran recursos forestales, pero no son parte del patrimonio forestal y de fauna silvestre de la Nación.





### CONSTANCIA DE ASESORÍA DE PROYECTO DE TESIS

El que suscribe, Jaime Polo Gamboa. docente de la Escuela Profesional de Medicina de la Facultad de Ciencias Médicas.

#### Hace CONSTAR

Que, de conformidad con el Reglamento para elaboración y evaluación de Proyectos de Tesis, el(la) estudiante De la Cruz Ortiz, Marco Petronila de esta Superior Casa de Estudios, viene trabajando bajo mi asesoramiento el Proyecto de Tesis titulado:

Efecto bactericida del extracto oleoso de Artemisia absinthium  
contra Staphylococcus aureus ATCC 25923 concurrido con  
oxacilina, in vitro.

que será presentado para optar el Título Profesional de Médico Cirujano.

En tal virtud, asumo el asesoramiento del Proyecto mencionado en calidad de ASESOR ESPECIALISTA, tarea voluntaria y de cooperación académica con la Escuela de Medicina.

Expedido el presente a solicitud de la parte interesada sólo para fines académicos que estime conveniente.

Dado en la ciudad de Trujillo a los 05 días del mes de mayo del año 2020.

  
Jaime A. Polo Gamboa  
MICROBIOLOGO  
CBP 8951

#### CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO

El Laboratorio "San José" deja constancia que ha cedido *ad honorem* sus instalaciones, en donde MARÍA PETRONILA DE LA CRUZ ORTIZ, estudiante de Medicina de la Universidad César Vallejo de Trujillo, ejecutó la parte experimental de su proyecto de tesis titulado "Efecto bactericida del extracto oleoso de *Artemisia absinthium* contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 confrontado con Oxacilina, *in vitro*", durante los días 22 al 27 de septiembre de 2020, bajo la orientación y asesoramiento del Microbiólogo Jaime Abelardo Polo Gamboa.

Se expide la presente a solicitud del estudiante, sólo para fines académicos, a los 27 días del mes de octubre de 2020.



José Luis Cotto Quirós  
Médico - Microbiólogo  
C.R.P. 6301

**Sede Principal: Francisco Bolognesi 678 Of. 203 - Centro Histórico - Trujillo**

**Sucursales: Los Cerales 277- Barrio Médico Urb. Santa Inés - Trujillo**

**☎ 769999 - ☎ 948649844**

**✉ [sanjeselabs@hotmail.com](mailto:sanjeselabs@hotmail.com) 🌐 [www.sanjeselabs.amawebs.com/](http://www.sanjeselabs.amawebs.com/)**